

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 29 SEP 2000

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Ep 00/07253

Aktenzeichen:

199 55 605.9

4

Anmeldetag:

18. November 1999

Anmelder/Inhaber:

BASF AG, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung:Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und
deren Verwendung zur Oxidation von N-
heterocyclischen Aromaten**IPC:**

C 12 N 9/02



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Seller

Neue Cytochrom P450-Monooxygenasen und deren Verwendung zur Oxidation von N-heterocyclischen Aromaten

5

10

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytochrom-P450-Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

15

20

25

30

Enzyme mit neuartigen Funktionen und Eigenschaften können entweder durch Screening natürlicher Proben oder durch Protein Engineering bekannter Enzyme bereitgestellt werden. Die letztgenannte Methode kann unter Umständen die geeignetere sein, um Eigenschaften zu induzieren, deren Generierung auf dem Wege natürlicher Selektion unwahrscheinlich ist. Trotz zahlreicher Anstrengungen zum Engineering von Enzymen gibt es bisher nur wenige erfolgreiche Studien zur Förderung der katalytischen Aktivität von Enzymmutanten bezüglich eines bestimmten Substrates (1-10). In diesen bekannten Fällen sind die Substrate strukturell eng verwandt mit dem nativen Substrat des jeweiligen Enzyms. Bisher gibt es keine Berichte über ein erfolgreiches Engineering von Enzymen, welche nach der Modifikation die Umsetzung einer Verbindung katalysieren, welche strukturell völlig verschieden vom nativen Substrat des Enzyms ist.

35

Die aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* isolierbare Cytochrom P450-Monooxygenase katalysiert gewöhnlich die subterminale Hydroxylierung langkettiger, gesättigter Säuren und der entsprechenden Amide und Alkohole davon oder die Epoxydation ungesättigter langkettiger Fettsäuren oder gesättigter Fettsäuren mit mittlerer Kettenlänge (11-13). Die optimale Kettenlänge gesättigter Fettsäuren beträgt 14 bis 16 Kohlenstoffatome. Fettsäuren mit einer Kettenlänge von weniger als 12

werden nicht hydroxyliert (11).

Die Struktur der Häm-Domäne von P450 BM-3 wurde durch Röntgen-
strukturanalyse bestimmt (14-16). Die Substratbindungsstelle
liegt in Form einer langen tunnelartigen Öffnung vor, welche
von der Moleküloberfläche bis hin zum Häm-Molekül reicht und
wird fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäureresten be-
grenzt. Die einzigen geladenen Reste an der Oberfläche der
Häm-Domäne sind die Reste Arg47 und Tyr51. Man nimmt an, daß
diese an der Bindung der Carboxylatgruppe des Substrates durch
Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt sind (14).
Die Mutation von Arg47 zu Glu bewirkt eine Inaktivierung des
Enzyms für Arachidonsäure (13), erhöht jedoch dessen Aktivität
gegenüber C₁₂-C₁₄-Alkyltrimethylammonium-Verbindungen (17). Eine
Substratnutzung für aromatische Verbindungen, insbesondere
zwei- oder mehrkernige N-heterocyclische Aromaten, wurde für
dieses Enzym nicht beschrieben. Es wurde deshalb bisher in
der Fachwelt angenommen, daß Indol aufgrund der deutlichen
strukturellen Unterschiede zu den nativen Substraten von P450
BM-3, insbesondere aufgrund des Fehlens funktioneller Gruppen,
welche an die oben erwähnten Reste in der Substrattasche bin-
den könnten, kein Substrat darstellen.

Es ist deshalb Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Cyto-
chrom P450 Monooxygenasen mit veränderter Substratspezifität
bereit zu stellen. Insbesondere sollten Monooxygenase-Mutanten
Bereitgestellt werden, welche im Vergleich zu dem nichtmutier-
ten Enzym mit strukturell deutlich anderen Substraten enzyna-
tisch aktiv sind.

Diese Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch
Cytochrom P450 Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocy-
clischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen be-
fähigt ist.

Insbesondere sind Gegenstand der Erfindung solche Monooxygena-
sen, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische
Mutagenese zur funktionalen Aufnahme des N-heterocyclischen

Substrats befähigt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die neuen Monooxygenase löslich, d.h. in nicht-membrangebundener Form existent, und in dieser Form enzymatisch aktiv.

Die erfindungsgemäßen Monooxygenasen sind vorzugsweise abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs, wie insbesondere abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenase BM-3 aus *Bacillus megaterium* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionelle, d.h. die Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen fördernde Mutation, in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224 (F/G-loop-Bereich), 39-43 (β-strand 1), 48-52 (β-strand 2), 67-70 (β-strand 3), 330-335 (β-strand 5), 352-356 (β-strand 8), 73-82 (helix 5) und 86-88 (helix 6) aufweist.

Besonders bevorzugten Monooxygenase-Mutanten dieses Typs sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:

- a) Phe87Val;
- b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
- c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;

sowie funktionale Äquivalente davon. Funktionale Analoga sind in diesem Zusammenhang davon verschiedene Mutanten welche weiterhin die gewünschte Substratspezifität gegenüber heterozyklischen Aromaten besitzen und insbesondere Indol hydroxylisieren.

Erfindungsgemäß oxidierbare, insbesondere hydroxylierbare N-heterocyclische zwei- oder mehrkernige aromatische Verbindungen umfassen vorzugsweise zwei oder drei, insbesondere zwei, vier- bis siebengliedrigen, insbesondere sechs- oder fünf-gliedrige, kondensierte Ringe, wobei wenigstens einer, vorzugsweise alle Ringe aromatischen Charakter besitzen und wobei wenigstens einer der Ringe ein bis drei, vorzugsweise ein N-Heteroatom trägt. In der Ringstruktur können gegebenenfalls

ein oder zwei weitere Heteroatome, wie O und S, enthalten sein. Die aromatischen Verbindungen können weiterhin 1 bis 5 Substituenten an den Ring-Kohlenstoff- oder an den Heteroatomen tragen. Beispiele für geeignete Substituenten sind Methyl, Hydroxyl und Halogen, wie F, Cl, und Br. Nichtlimitierende Beispiele für geeignete Substrate sind Indol, N-Methyl-indol und die mit ein bis drei Substituenten an Kohlenstoffatomen substituierten Analoga davon.

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen, kodierend für eine der obigen Monooxygenasen. Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO:1, welche wenigstens eine Nukleotidsubstitution aufweist, die zu einer der oben beschriebenen funktionellen Aminosäuremutationen führt. Außerdem sind die davon abgeleiteten, an die Kodonnutzung verschiedener Wirtsorganismen angepaßten Sequenzen Gegenstand der Erfindung. Gegenstand der Erfindung sich außerdem durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide erhaltenen funktionalen Analoga der Nukleinsäuren, welche weiterhin für eine Monooxygenase mit der gewünschten Substratspezifität, insbesondere mit Indol-oxidierender Aktivität, kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen, wie einem 5'-stromaufwärts gelegenen konstitutiven oder nicht-konstitutiven Promotor und 3'-stromabwärts gelegenen Terminator, eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition umfasst. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, Wie der P_{rP_1} -Promotor. Weitere regulative Elemente umfassen Enhancer, selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge Polyadenylierungssignale und dergleichen.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Vektoren, wie z.B. Viren und Plasmide, umfassend wenigstens eines der erfindungs-

gemäßen Expressionskonstrukte. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin rekombinante Mikroorganismen, transformiert mit wenigstens einem solchen Vektor. Bevorzugte Mikroorganismen sind ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*, wie z. B. *E. coli*.

Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen gemäß obiger Definition, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus gemäß obiger Definition in einem Kulturmedium, gegebenenfalls in Gegenwart eines Substrats, kultiviert; oder
- a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem erfindungsgemäßen Enzym inkubiert; und
- b) das gebildete Oxidationsprodukt, oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

Eine bevorzugte Verfahrensvariante ist auf die Bildung von Indol/Indirubin gerichtet und dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem Medium das gebildete Indol und/oder Indirubin isoliert.

Wird die Umsetzung mit einem rekombinanten Mikroorganismus durchgeführt, so erfolgt vorzugsweise zunächst die Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff und in einem Komplexmedium, wie z.B. TB- oder LB- Medium bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 kultiviert, bis eine ausreichende Zelldichte erreicht ist. Die Zugabe von Indol ist gewöhnlich nicht erforderlich, da dieses vom Mikroorganismus intermediär gebildet wird. Im die Oxidationsreaktion besser steuern zu können, bevorzugt man die Verwendung eines induzierbaren, insbesondere temperaturinduzierbaren, Promotors. Man erhöht dabei die Temperatur auf die erforderliche Induktionstemperatur, z.B. 42 °C beim P_{rP_1} -Promotor, behält dies über einen ausreichenden Zeitraum, z. B. 1 bis 10 oder 5 bis 6 Stunden, zur Expression der Monooxygenase-Aktivität bei und verringert anschließend der

Temperatur wieder einer Wert von etwa 30 bis 40 °C. Die Kultivierung wird dann in Gegenwart von Sauerstoff 12 Stunden bis 3 Tage fortgesetzt. Der pH-Wert kann dabei durch Zugabe von NaOH, z.B. auf 9 bis 10, erhöht werden, wodurch die Indigobildung bzw. Indirubinbildung durch Luftoxidation der enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte 2- und 3-Hydroxyindol zusätzlich gefördert wird.

Wird die Umsetzung dagegen mit gereinigtem oder angereichertem Enzym durchgeführt so löst man das erfindungsgemäße Enzym in einem Indol-haltigen Medium (etwa 0,01 bis 10 mM, oder 0,05 bis 5 mM, und führt die Umsetzung bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50 °C, wie z.B. 30 bis 40 °C, und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 (wie z.B. eingestellt mit 100 bis 200 mM Phosphat- oder Tris-Puffer), sowie in Gegenwart eines Reduktionsmittels durch, wobei das Indol-haltige Medium außerdem bezogen auf Indol einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält. Bevorzugtes Reduktionsmittel ist NADPH.

Das gebildete Oxidationsprodukt kann dann in herkömmlicher Weise, wie z.B. durch Extraktion oder Chromatographie, vom Medium abgetrennt und gereinigt werden.

Weitere Gegenstände der Erfindung betreffen Bioreaktoren, umfassend ein erfindungsgemäßes Enzym oder einen erfindungsgemäßen rekombinanten Mikroorganismus in immobilisierter Form.

Ein letzter Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Cytochrom P450 Monooxygenase oder eines erfindungsgemäßen Vektors oder Mikroorganismus zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, insbesondere im Rahmen der Bildung von Indigo und/oder Indirubin.

Die vorliegende Erfindung wird nunmehr unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1:Randomisierung spezieller Codons von P450 BM-3

5 Die Versuche wurden im wesentlichen wie beschrieben in (19)
durchgeführt. Drei Positionen (Phe87, Leu188 und Ala74) wurden
mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese unter Verwendung des
Stratagene QuikChange kit (La Jolla, CA, USA) randomisiert.
Folgende PCR-Primer wurden für die einzelnen Positionen ver-
10 wendet: Phe87: 5'-gcaggagacgggttgnnnacaagctggacg-3' (SEQ ID
NO:3), 5'-cgtccagcttgtnnncaaccgcgtctcctgc-3', (SEQ ID NO:4)
Leu188: 5'-gaagcaatgaacaagnnncagcgagcaaatccag-3' (SEQ ID
NO:5), 5'-ctggatttgctcgctgtnnncttgttcattgcttc-3' (SEQ ID NO:6;
Ala74: 5'-gctttgataaaaacttaaagtcaannncttaaatttgtagc-3' (SEQ ID:
15 No:7, 5'-cgtacaaatttaagnnnttgacttaagtttttatcaaagc-3' (SEQ ID
NO:8)

Die Bedingungen für die PCR waren für alle drei Positionen
identisch. Insbesondere wurden je 50 µl Reaktionsvolumen 17,5
20 pmol eines jeden Primers, 20 pmol Template-Plasmid-DNA, 3 U
der Pfu Polymerase und 3,25 nmol von jedem dNTP verwendet. Die
PCR Reaktion wurde bei 94°C /1 min gestartet und dann wurde
folgender Temperaturzyklus 20 mal durchgeführt: 94°C, 1 min;
46°C, 2,5 min; 72°C, 17 min. Nach 20 Zyklen wurde die Reaktion
25 15 min bei 72°C fortgesetzt. Nach der PCR wurde die Template
DNA mit 20 U DpnI bei 37°C 3 h verdaut. Anschließend wurde *E.*
coli DH5α transformiert. Die transformierten *E. coli* DH5α-Zel-
len wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert, welche 150 µg/ml
Ampicillin enthielten. Anschließend wurde 18 h bei 37°C inku-
30 biert.

Beispiel 2:

Expression und Reinigung der P450 BM-3 und dessen Mutanten und
35 Produktion eines blauen Pigmentes

Das P450 BM-3-Gen und die Mutanten davon wurden unter der Kon-
trolle des starken, Temperatur-induzierbaren P_RP_L-Promotors des

Plasmids pCYTEXP1 in *E. coli* DH5 α wie bereits beschrieben (20), exprimiert. Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen, enthaltend je Vertiefung 200 μ l TB-Medium und 100 μ g/ml Ampicillin transferiert. Anschließend wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. 40 μ l der Zellkultur einer jeden Vertiefung wurden anschließend in ein Kulturröhrchen überführt, das 2 ml TB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin enthält. Anschließend wurde 2 h bei 37°C kultiviert. Dann wurde die Tempertur zur Induktion 6 h auf 42°C erhöht. Dann wurde die Kultivierung über Nacht bei 37°C fortgesetzt, wobei ein blaues Pigment produziert wurde.

Die präparative Herstellung von Enzym oder blauem Pigment wurde ausgehend von einer 300 ml Zellkultur ($OD_{578nm} = 0,8$ bis 1,0) durchgeführt. Zur Isolierung des Enzymes wurden die Zellen 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert, in 0,1 M K_xPO_4 -Puffer, pH 7,4 resuspendiert. Die eisgekühlten Zellen wurden mit Hilfe eines Branson Sonifiers W25 (Dietzenbach, Deutschland) bei einer Energieoutput von 80 W durch dreimalige Beschallung von 2 min vorsichtig aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden 20 min bei 32570 x g zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde zur Aktivitätsbestimmung bzw. zur Enzymreinigung eingesetzt. Die Enzymreinigung erfolgte wie in (21) bereits beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird. Die Konzentration an gereinigtem Enzym wurde über die Extinktionsdifferenz bei 450 und 490 nm, wie in (11) bereits beschrieben, unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten ϵ von 91 mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ bestimmt.

Beispiel 3:

Isolierung von Mutanten, welche große Mengen an blauem Pigment produzieren.

Jeweils 100 Kolonien wurden von den Mutanten einer jeden Position isoliert, welche durch randomisierte Mutagenese des Codons der entsprechenden Position erzeugt wurden. Diese Kolonien wurden in Kulturröhrchen zur Produktion von blauem Pigment kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit Wasser und

mehreren langsamen Zentrifugationsschritten (500 Upm) wurde das blaue Pigment mit Dimethylsulfoxid (DMSO) extrahiert. Die Löslichkeit des blauen Pigmentes war in DMSO am größten. Die Absorption des Extraktes wurde bei 677 nm bestimmt. Diejenige Mutante, welche die größte Menge an blauem Pigment von allen Mutanten einer bestimmten Position produzierte, wurde für eine DNA-Sequenzierung (ABI-DNA-Sequenzierungs-Kit; ABI Prism™ 377 DNA Sequencer) verwendet und außerdem als Template für orts-spezifische randomisierte Mutagenese verwendet.

Beispiel 4:

Aktivitätstest für die Indol-Hydroxylierung.

Die Indol-Hydroxylierungsaktivität wurde in einer Lösung getestet, die 8 µl einer 10-500 mM Indollösung in DMSO, 850 µl Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 0,6 nmol P450_{BM-3} Wildtyp oder Mutante in einem Endvolumen von 1 ml enthielt. Das Gemisch wurde 9 min vorinkubiert, bevor man die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer wässrigen 1 mM Lösung von NADPH startete. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch Zugabe von 60 µl 1,2 M KOH gestoppt. Innerhalb von 5 bis 30 sec (unter aeroben Bedingungen) wurden die Enzymprodukte vollständig in Indigo [$\Delta^{2,2'}$ -Biindolin]-3,3'-dion) und Indirubin ([$\Delta^{2,3'}$ -Biindolin]-2',3-dion) überführt. Die Indigoproduktion wurde über dessen Absorption bei 670 nm bestimmt. Eine Eichkurve mit reinem Indigo zeigte einen Extinktionskoeffizienten von $3,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei dieser Wellenlänge. Ein linearer Kurvenverlauf wurde für die Indigoproduktion in einer Reaktionszeit von 40 sec unter Verwendung von 0,6 nmol Wildtyp bzw. P450_{BM-3}-Mutante und 0,05 bis 5,0 mM Indol erhalten. Indirubin zeigt eine sehr schwache Absorption bei 670 nm und die gebildete Indirubinmenge war sehr viel geringer als die gebildete Indigomenge. Die Bildung von Indirubin wurde bei der Bestimmung der kinetischen Parameter vernachlässigt. Der NADPH-Verbrauch wurde bei 340 nm bestimmt und unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wie beschrieben (17) berechnet.

Beispiel 5:Reinigung von Indigo und Indirubin

5 Nach Waschen der Zellen mit Wasser und wiederholter Zentrifugation bei 500 g wurde das gebildete blaue Pellet mit Tetrahydrofuran (THF) extrahiert. Der Extrakt wurde bis fast zur Trockene eingedampft und das rote Pigment wurde mehrmals mit
10 50 ml absolutem Ethanol extrahiert. Der verbleibende blaue Feststoff wurde in THF gelöst und durch Dünnschichtchromatographie (TLC) analysiert. Die Ethanollösung wurde eingedampft und durch Silicagelchromatographie (DC 60, Merck, Darmstadt, Deutschland; 2 cm x 30 cm) gereinigt, bevor sie mit THF und
15 Petrolether in einem Verhältnis von 1:2 gewaschen wurde. Die erhaltene rote Lösung wurde eingedampft und deren Reinheit wurde durch TLC bestimmt. Die Absorptionsspektren des blauen und des roten Pigmentes wurden mit Hilfe eines Ultraspec 3000 Spektrophotometers (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in einem Bereich von 400 bis 800 nm bestimmt. Außerdem wurde der blaue
20 und der rote Farbstoff durch Massenspektrometrie und ¹H-NMR Spektroskopie analysiert.

Versuchsergebnisse

25 1. Erhöhung der Produktivität für blaues Pigment durch P450 BM-3-Mutagenese

Natives P450 BM-3 besitzt nicht die Fähigkeit zur Produktion des blauen Indigo-enthaltenden Pigments, bzw. der Vorläufer-
30 ~~substanten 2- bzw 3-Hydroxyindol. Um eine ausreichende Menge~~
an blauem Pigment herstellen zu können, wurde P450 BM3 einer gezielten Evolution ausgesetzt. Sämtliche Mutanten, welche das blaue Pigment produzierten, wurden sequenziert. Es wurde festgestellt, daß wenigstens eine der folgenden drei Positionen
35 mutiert waren: Phe87, Leu188 und Ala74. Es wurde deshalb angenommen, daß diese drei Positionen eine entscheidende Rolle für die Aktivität von P450 BM-3 bei der Produktion von blauem Pigment spielen. Aus der Struktur der Häm-Domäne von

Cytochrom-P450-BM 3, komplexiert mit Palmitoleinsäure sieht man, daß Phe87 das Substrat an einem näheren Heranrücken an die Häm-Gruppe hindert (14). Die Mutante Phe87Val zeigt eine hohe Regio- und Stereoselektivität bei der Epoxidation von (14S, 15R)-Arachidonsäure (13) und die Mutante Phe87Ala verschiebt die Hydroxylierungsposition von ω -1, ω -2 und ω -3 zu ω (22). Die Position 87 wurde deshalb als erste für die ortsspezifische randomisierte Mutagenese mit Hilfe von PCR ausgewählt. In Röhrenkulturen wurden 7 Kolonien erhalten, welche eine geringe Menge an blauem Pigment nach Induktion produzierten. Die Kolonie, welche die größte Menge des blauen Pigments produzierte, wurde für die DNA-Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzdaten ergaben eine Substitution von Phe87 durch Val. Die Mutante Phe87Val wurde anschließend als Template für die zweite Runde der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese an Position Leu188 verwendet. Die Struktur der Häm-Domäne, komplexiert mit Palmitoleinsäure, zeigt, daß die Repositionierung der F- und G-Helices den Rest Leu188 in indirekten Kontakt mit dem Substrat bringt (14). Diese Position könnte deshalb eine wichtige Rolle bei der Substratbindung oder Orientierung spielen. Nach dem zweiten Screeningdurchgang wurden 31 Kolonien beobachtet, welche das blaue Pigment produzierten. Die Mutante, welche die größte Pigmentmenge produzierte, enthielt die Substitutionen Phe87Val und Leu188Gln. Diese Mutante wurde anschließend in Position Ala74 im dritten Durchgang der ortsspezifischen randomisierten Mutagenese mutiert. Man erhielt dabei die Dreifachmutante F87L188A74 (Phe87Val, Leu188Gln und Ala74Gly), welche mehrere mg blaues Pigment in einem 2-Liter-Kolben, enthaltend 300 ml TB-Medium, produzierte. Diese Menge reichte zur Isolierung und Charakterisierung des blauen Pigmentes aus.

2. Isolierung und Identifizierung des blauen Pigments

Nach dem Auswaschen der Zellen wurde das verbleibende blaue Pellet mit THF extrahiert und TLC analysiert. Das blaue Pigment wurde in eine schneller wandernde blaue Komponente und in eine langsamer wandernde rote Komponente aufgetrennt. Beide Komponenten zeigten exakt die gleichen Mobilitätsparameter wie

die Komponenten einer kommerziellen Indigo-Probe.

Nach der Reinigung wurden die Absorptionsspektren beider Komponenten in DMSO bestimmt. Die blaue Komponente zeigte das gleiche Spektrum wie eine kommerzielle Indigoprobe. Die gereinigte blaue und rote Komponente wurden jeweils durch Massenspektrometrie analysiert. Die Massenspektren beider Pigmente zeigten einen starken Molekülionenpeak bei $m/z = 262$ und zwei Fragmentationenpeaks bei $m/z = 234$ und 205 (relative Intensität jeweils 10%). Dieses Muster ist typisch für indigoide Verbindungen. Die Elementarzusammensetzung dieser Ionen wurde durch hochauflösende Massenspektrometrie bestimmt als $C_{16}H_{10}N_2O_2$, $C_{15}H_{10}N_2O$ bzw. $C_{14}H_9N_2$. Dies ist ebenfalls charakteristisch für Strukturen vom Indigotyp. Das blaue Pigment wurde somit als Indigo und das rote Pigment als Indirubin bestimmt. Zur Bestätigung der Struktur wurden 500 MHz 1H -NMR-Spektren beider Pigmente in DMSO- D_6 -Lösung durchgeführt. Die Ergebnisse stimmten mit den Literaturangaben (23) überein.

3. Produktion von Indigo mit isolierten Enzymen.

Es ist bekannt, daß Indigo aus Indol durch mikrobielle Transformation zugänglich ist (24-26). Keines dieser mikrobiellen Systeme enthielt jedoch eine P450 Monooxygenase. Erfindungsgemäß wurde zunächst die katalytische Aktivität des reinen Enzyms für Indol bestimmt. Die Mutante F87L188A74 wurde mit Indol vermischt. Keine Farbreaktion war zu beobachten. Erst nach Zugabe von NADPH zum Reaktionsgemisch bildete sich das blaue Pigment nach etwa 20 min. Durch Einstellung des pH-Werts der Reaktionsmischung auf einen Wert von etwa 11, 30 sec nach Zugabe von NADPH, wurde die blaue Färbung innerhalb von wenigen Sekunden sichtbar. Kontrollversuche unter Verwendung von nativem P450 BM-3 waren immer negativ, selbst unter Verwendung erhöhter Konzentrationen an Enzym, Indol und NADPH. Das blaue Pigment wurde mit Ethylacetat extrahiert und durch TLC analysiert. Das blaue Pigment trennte sich wieder in eine schneller laufende blaue Komponente und in eine langsamer laufende rote Komponente auf. Die R_f -Werte und die Absorptionsspektren waren

identisch mit denjenigen Werten der Extrakte aus der Fermentationsbrühe. Die F87L188A74-Mutante von P450 BM-3 stellt somit eine Indolhydroxylase dar.

Es sind bisher zwei Wege für die enzymatische Transformation von Indol zu Indigo beschrieben worden. Ein Weg wird durch eine Dioxxygenase, oder andere, durch eine Styrolmonooxygenase katalysiert (24,25). Die NADPH-Stöchiometrie beträgt in beiden Fällen 2. Es wurde deshalb angenommen, daß im Gegensatz zu den Dioxxygenasen die erfindungsgemäße Mutante F87L188A74 Indol in nur einer Position hydroxyliert, um Oxindol (2-Hydroxyindol) oder Indoxyl (3-Hydroxyindol) zu bilden.

4. Kinetische Parameter der Indolhydroxylierung.

Reine Proben des Wildtyp-Enzyms P450 BM-3 und der Mutanten Leu188Gln, Phe87Val, F87L188 und F87L188A74 wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Indolhydroxylierung verwendet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 1. zusammengefaßt.

Tabelle 1 Kinetische Parameter der P450 BM-3 Mutanten für Indolhydroxylierung

Mutanten	K_{cat} (S^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
WT	^{a)}	-	-
Leu188Gln	n.d. ^{b)}	n.d.	n.d.
Phe87Val	2,03 (0,14)	17,0 (1,0)	119
F87L188	2,28 (0,16)	4,2 (0,4)	543
F87L188A74	2,73 (0,16)	2,0 (0,2)	1365

^{a)} keine Aktivität wurde beobachtet;

^{b)} nicht bestimmt (Aktivität war zu gering um gemessen zu werden)

Selbst beim Überschuß an gereinigtem Enzym und hoher Indolkonzentration ist das Wildtyp-Enzym nicht in der Lage, Indol zu oxidieren. Die Mutante Leu188Gln zeigt eine geringe Aktivität. Die Mutante Phe87Val zeigt eine katalytische Wirksamkeit von $119 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für die Indolhydroxylierung. Die katalytische Effizienz der Doppelmutante F87L188 (Phe87Val, Leu188Gln) erhöhte sich auf $543 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und wurde durch Einführung der weiteren Substitution Ala74Gly auf $1365 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erhöht. Die K_{cat} -Werte erhöhten sich von Phe87Val zur Dreifachmutante hin um insgesamt 35%, während die K_{m} -Werte etwa um das Siebenfache abnahmen. Dies weist darauf hin, daß Ala74Gly und Leu188Gln vorwiegend an der Substatbindung beteiligt sind.

Die Indol-Turnover-Rate ($K_{\text{cat}}=2,73 \text{ s}^{-1}$) war für die Dreifachmutante F87L188A74 mehr als zehnfach höher als für die meisten P450-Enzyme (18).

LITERATUR

1. Yano, T., Oue, S., and Kagamiyama, H. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5511-5515.
2. Zhang, J.-H., Dawes, G., and Stemmer, W. P. C. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 4504-4509.
3. Wan, L., Twitchett, M. B., Eltis, L. D., Mauk, A. G., and Smith, M. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12825-12831.
4. Cronin, C. N. (1998) J. Biol. Chem 273, 24465-24469.
5. Wilks, H. M., Hart, K. W., Feeney, R., Dunn, C. R., Muirhead, H., Chia, W. N., Barstow, D. A., Atkinson, T., Clarke, A. R., Holbrook, I. J. (1988) Science 242, 1541-1544.
6. Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W. J. (1992) Science 255, 1249-1253.
7. Tucker, C. L., Hurley, J. H., Miller, T. R., and Hurley, I. B. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5993-5997.
8. Quemeneur, E., Moutiez, J.-B. C., and Menez, A. (1998) Nature (London) 391, 301-303.
9. Marsden, A. F. A., Wilkinson, B., Cortes, J., Dunster, N. J., Staunton, I., Leadlay, P. F. (1998) Science 279, 199-201.
10. Chen, R., Greer, A., and Dean, A. M. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 11666-11670.
11. Boddupalli, S. S., Estabrook, R. W. and Peterson, J. A. (1990) J Biol. Chem 265, 4233-4239.
12. Capdevila, J. H., Wie, S., Helvig, C., Falck, J. R., Be-

losludtsev, Y., Truan, G., Graham-Lorence, S. E., and Peterson, J. A. (1996) J. Biol. Chem 271, 22663-22671.

13. Graham-Lorence, S., Truan, G., Peterson, J. A., Flack, J. R., WeL S., Helvig, C., Capdevilla, J. H. (1997) J. Biol. Chem 272, 1127-1135.

14. Li, H., Poulos, T. L. (1997) Nat. Structural Biol., 4, 140-146.

15. Ravichandran, K G., Sekhar, S., Boddupalli, S., Hasemann, C. A., Peterson, J. A., Deisenhofer, 1 (1993) Science 261, 731-736.

16. Modi S., Sutcliffe, M. J., Primrose, W. U., Lian, L.- Y., Roberts, G. C. K (1996) Nat. Structural Biol. 3, 414-417.

17. Oliver, C.F., ModL S., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K (1997) Biochem. J 327, 537-544.

18. Guengerich, F.G. (1991) J. Biol. Chem 266, 10019-10022.

19. Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A-, Jones, A., and Pedersen, A. H. (1999) Nature Biotechnology 17, 379-384.

20. Schwaneberg, U., Schmidt-Dannert, C., Schmitt, J., and Schmid, R. D. (1999) Anal Biochem. 269, 359-366.

~~21. Schwaneberg, U., Sprauer, AL, Schmidt-Dannert, C., and Schmid, R. D. J of Chromatogr. A, in press.~~

22. Oliver, C.F., Modi, S., Sutcliffe, M.J., Primrose, W.U., Lian, L.Y. and Roberts, G.C.K (1997) Biochemistry 36, 1567-1572.

23. Hart, S., Koch, KR., and Woods, D.R. (1992) J Gen. Microbiol. 138, 211-216

24. Murdock, D., Ensley, B.D., Serdar, C. and Thalen, M.
(1993) Bio/Technology 11, 381-385.

25. O'Connor, J.C.E., Debson, A.W. and Hartmans, S. (1997)
Appl. Environ. Microbiol. 63, 4287-4291.

26. Eaton, R. W. and Chapman, P. J. (1995) J Bacteriol. 177,
6983-6988.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Indigo-produzierende Cytochrom P450 Monooxygenasen

<130> M/40241

<140>

<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3150

<212> DNA

<213> Bacillus megaterium

<220>

<221> CDS

<222> (4)..(3150)

<400> 1

atg aca att aaa gaa atg cct cag cca aaa acg ttt gga gag ctt aaa	48
Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys	
1 5 10 15	
aat tta ccg tta tta aac aca gat aaa ccg gtt caa gct ttg atg aaa	96
Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys	
20 25 30	
att gcg gat gaa tta gga gaa atc ttt aaa ttc gag gcg cct ggt cgt	144
Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg	
35 40 45	
gta acg cgc tac tta tca agt cag cgt cta att aaa gaa gca tgc gat	192
Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp	
50 55 60	
gaa tca cgc ttt gat aaa aac tta agt caa gcg ctt aaa ttt gta cgt	240
Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg	
65 70 75	
gat ttt gca gga gac ggg tta ttt aca agc tgg acg cat gaa aaa aat	288
Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn	
80 85 90 95	
tgg aaa aaa gcg cat aat atc tta ctt cca agc ttc agt cag cag gca	336
Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala	
100 105 110	
atg aaa ggc tat cat gcg atg atg gtc gat atc gcc gtg cag ctt gtt	384
Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val	
115 120 125	
caa aag tgg gag cgt cta aat gca gat gag cat att gaa gta ccg gaa	432
Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu	
130 135 140	
gac atg aca cgt tta acg ctt gat aca att ggt ctt tgc gcc ttt aac	480
Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn	

145	150	155	
tat cgc ttt aac agc ttt tac cga gat cag cct cat cca ttt att aca			528
Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr			
160	165	170	175
agt atg gtc cgt gca ctg gat gaa gca atg aac aag ctg cag cga gca			576
Ser Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala			
180	185	190	
aat cca gac gac cca gct tat gat gaa aac aag cgc cag ttt caa gaa			624
Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu			
195	200	205	
gat atc aag gtg atg aac gac cta gta gat aaa att att gca gat cgc			672
Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg			
210	215	220	
aaa gca agc ggt gaa caa agc gat gat tta tta acg cat atg cta aac			720
Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn			
225	230	235	
gga aaa gat cca gaa acg ggt gag ccg ctt gat gac gag aac att cgc			768
Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg			
240	245	250	255
tat caa att att aca ttc tta att gcg gga cac gaa aca aca agt ggt			816
Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly			
260	265	270	
ctt tta tca ttt gcg ctg tat ttc tta tgc aaa aac cca cat gta tta			864
Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu			
275	280	285	
caa aaa gca gca gaa gaa gca gca cga gtt cta gta gat cct gtt cca			912
Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro			
290	295	300	
agc tac aaa caa gtc aaa cag ctt aaa tat gtc ggc atg gtc tta aac			960
Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn			
305	310	315	
gaa gcg ctg cgc tta tgg cca act gct cct gcg ttt tcc cta tat gca			1008
Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala			
320	325	330	335
aaa gaa gat acg gtg ctt gga gga gaa tat cct tta gaa aaa ggc gac			1056
Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp			
340	345	350	
gaa cta atg gtt ctg att cct cag ctt cac cgt gat aaa aca att tgg			1104
Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp			
355	360	365	
gga gac gat gtg gaa gag ttc cgt cca gag cgt ttt gaa aat cca agt			1152
Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser			
370	375	380	
gcg att ccg cag cat gcg ttt aaa ccg ttt gga aac ggt cag cgt gcg			1200
Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala			
385	390	395	
tgt atc ggt cag cag ttc gct ctt cat gaa gca acg ctg gta ctt ggt			1248

Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly	
400 405 410 415	
atg atg cta aaa cac ttt gac ttt gaa gat cat aca aac tac gag ctg	1296
Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu	
420 425 430	
gat att aaa gaa act tta acg tta aaa cct gaa ggc ttt gtg gta aaa	1344
Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys	
435 440 445	
gca aaa tcg aaa aaa att ccg ctt ggc ggt att cct tca cct agc act	1392
Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr	
450 455 460	
gaa cag tct gct aaa aaa gta cgc aaa aag gca gaa aac gct cat aat	1440
Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn	
465 470 475	
acg ccg ctg ctt gtg cta tac ggt tca aat atg gga aca gct gaa gga	1488
Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly	
480 485 490 495	
acg gcg cgt gat tta gca gat att gca atg agc aaa gga ttt gca ccg	1536
Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro	
500 505 510	
cag gtc gca acg ctt gat tca cac gcc gga aat ctt ccg cgc gaa gga	1584
Gln Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly	
515 520 525	
gct gta tta att gta acg gcg tct tat aac ggt cat ccg cct gat aac	1632
Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn	
530 535 540	
gca aag caa ttt gtc gac tgg tta gac caa gcg tct gct gat gaa gta	1680
Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val	
545 550 555	
aaa ggc gtt cgc tac tcc gta ttt gga tgc ggc gat aaa aac tgg gct	1728
Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala	
560 565 570 575	
act acg tat caa aaa gtg cct gct ttt atc gat gaa acg ctt gcc gct	1776
Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala	
580 585 590	
aaa ggg gca gaa aac atc gct gac cgc ggt gaa gca gat gca agc gac	1824
Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp	
595 600 605	
gac ttt gaa ggc aca tat gaa gaa tgg cgt gaa cat atg tgg agt gac	1872
Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp	
610 615 620	
gta gca gcc tac ttt aac ctc gac att gaa aac agt gaa gat aat aaa	1920
Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys	
625 630 635	
tct act ctt tca ctt caa ttt gtc gac agc gcc gcg gat atg ccg ctt	1968
Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu	
640 645 650 655	

gcg aaa atg cac ggt gcg ttt tca acg aac gtc gta gca agc aaa gaa 2016
Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu
660 665 670

ctt caa cag cca ggc agt gca cga agc acg cga cat ctt gaa att gaa 2064
Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu
675 680 685

ctt cca aaa gaa gct tct tat caa gaa gga gat cat tta ggt gtt att 2112
Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile
690 695 700

cct cgc aac tat gaa gga ata gta aac cgt gta aca gca agg ttc ggc 2160
Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly
705 710 715

cta gat gca tca cag caa atc cgt ctg gaa gca gaa gaa gaa aaa tta 2208
Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu
720 725 730 735

ct cat ttg cca ctc gct aaa aca gta tcc gta gaa gag ctt ctg caa 2256
la His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln
740 745 750

tac gtg gag ctt caa gat cct gtt acg cgc acg eag ctt cgc gca atg 2304
Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met
755 760 765

gct gct aaa acg gtc atg ccc ggc cat aaa gta gag ctt gaa gcc ttg 2352
Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu
770 775 780

ctt gaa aag caa gcc tac aaa gaa caa gtg ctg gca aaa cgt tta aca 2400
Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr
785 790 795

atg ctt gaa ctg ctt gaa aaa tac ccg gcg tgt gaa atg aaa ttc agc 2448
Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser
800 805 810 815

aa ttt atc gcc ctt ctg cca agc ata cgc ccg cgc tat tac tcg att 2496
lu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile
820 825 830

tct tca tca cct cgt gtc gat gaa aaa caa gca agc atc acg gtc agc 2544
Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser
835 840 845

gtt gtc tca gga gaa gcg tgg agc gga tat gga gaa tat aaa gga att 2592
Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile
850 855 860

gcg tcg aac tat ctt gcc gag ctg caa gaa gga gat acg att acg tgc 2640
Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys
865 870 875

ttt att tcc aca ccg cag tca gaa ttt acg ctg cca aaa gac cct gaa 2688
Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu
880 885 890 895

acg ccg ctt atc atg gtc gga ccg gga aca ggc gtc gcg ccg ttt aga 2736
Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg
900 905 910

ggc ttt gtg cag gcg cgc aaa cag cta aaa gaa caa gga cag tca ctt 2784
 Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu
 915 920 925
 gga gaa gca cat tta tac ttc ggc tgc cgt tca cct cat gaa gac tat 2832
 Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr
 930 935 940
 ctg tat caa gaa gag ctt gaa aac gcc caa agc gaa ggc atc att acg 2880
 Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr
 945 950 955
 ctt cat acc gct ttt tct cgc atg cca aat cag ccg aaa aca tac gtt 2928
 Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val
 960 965 970 975
 cag cac gta atg gaa caa gac ggc aag aaa ttg att gaa ctt ctt gat 2976
 Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp
 980 985 990
 aa gga gcg cac ttc tat att tgc gga gac gga agc caa atg gca cct 3024
 Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro
 995 1000 1005
 gcc gtt gaa gca acg ctt atg aaa agc tat gct gac gtt cac caa gtg 3072
 Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val
 1010 1015 1020
 agt gaa gca gac gct cgc tta tgg ctg cag cag cta gaa gaa aaa ggc 3120
 Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly
 1025 1030 1035
 cga tac gca aaa gac gtg tgg gct ggg taa 3150
 Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
 1040 1045

<210> 2

<211> 1048

<212> PRT

<213> Bacillus megaterium

<400> 2

Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys Asn
 1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys Ile
 20 25 30

Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg Val
 35 40 45

Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp Glu
 50 55 60

Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg Asp
 65 70 75 80

Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn Trp
 85 90 95

Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala Met

100	105	110
Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val Gln 115 120 125		
Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu Asp 130 135 140		
Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Gys Gly Phe Asn Tyr 145 150 155 160		
Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr Ser 165 170 175		
Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala Asn 180 185 190		
Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu Asp 195 200 205		
Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg Lys 210 215 220		
Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn Gly 225 230 235 240		
Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg Tyr 245 250 255		
Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly Leu 260 265 270		
Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu Gln 275 280 285		
Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro Ser 290 295 300		
Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn Glu 305 310 315 320		
Ile Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala Lys 325 330 335		
Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp Glu 340 345 350		
Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp Gly 355 360 365		
Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser Ala 370 375 380		
Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala Cys 385 390 395 400		
Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly Met 405 410 415		
Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu Asp 420 425 430		
Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys Ala		

435					440					445					
Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Pro	Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Glu
450					455					460					
Gln	Ser	Ala	Lys	Lys	Val	Arg	Lys	Lys	Ala	Glu	Asn	Ala	His	Asn	Thr
465					470					475					480
Pro	Leu	Leu	Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Asn	Met	Gly	Thr	Ala	Glu	Gly	Thr
				485					490					495	
Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Ala	Met	Ser	Lys	Gly	Phe	Ala	Pro	Gln
			500					505					510		
Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Ser	His	Ala	Gly	Asn	Leu	Pro	Arg	Glu	Gly	Ala
		515					520					525			
Val	Leu	Ile	Val	Thr	Ala	Ser	Tyr	Asn	Gly	His	Pro	Pro	Asp	Asn	Ala
	530					535					540				
Lys	Gln	Phe	Val	Asp	Trp	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Val	Lys
445					550					555					560
Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Val	Phe	Gly	Cys	Gly	Asp	Lys	Asn	Trp	Ala	Thr
				565					570					575	
Thr	Tyr	Gln	Lys	Val	Pro	Ala	Phe	Ile	Asp	Glu	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys
			580					585					590		
Gly	Ala	Glu	Asn	Ile	Ala	Asp	Arg	Gly	Glu	Ala	Asp	Ala	Ser	Asp	Asp
		595					600					605			
Phe	Glu	Gly	Thr	Tyr	Glu	Glu	Trp	Arg	Glu	His	Met	Trp	Ser	Asp	Val
	610					615					620				
Ala	Ala	Tyr	Phe	Asn	Leu	Asp	Ile	Glu	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Lys	Ser
625					630				635					640	
Thr	Leu	Ser	Leu	Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Asp	Met	Pro	Leu	Ala
				645					650					655	
s	Met	His	Gly	Ala	Phe	Ser	Thr	Asn	Val	Val	Ala	Ser	Lys	Glu	Leu
			660					665					670		
Gln	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Arg	Ser	Thr	Arg	His	Leu	Glu	Ile	Glu	Leu
		675					680					685			
Pro	Lys	Glu	Ala	Ser	Tyr	Gln	Glu	Gly	Asp	His	Leu	Gly	Val	Ile	Pro
	690					695					700				
Arg	Asn	Tyr	Glu	Gly	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Thr	Ala	Arg	Phe	Gly	Leu
705					710					715				720	
Asp	Ala	Ser	Gln	Gln	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Lys	Leu	Ala
			725						730					735	
His	Leu	Pro	Leu	Ala	Lys	Thr	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Leu	Gln	Tyr
			740					745				750			
Val	Glu	Leu	Gln	Asp	Pro	Val	Thr	Arg	Thr	Gln	Leu	Arg	Ala	Met	Ala
		755					760					765			
Ala	Lys	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	His	Lys	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu



```
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer
```

<400> 3
gcaggagacg gggtgnnnac aagctggacg 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 4
cgtccagctt gtnnncaacc cgtctcctgc 30

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 5
gaagcaatga acaagnnnca gcgagcaaat ccag 34

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 6
ctggatttgc tcgctgnnnc ttgttcattg 30

<210> 7
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 7
gctttgataa aaacttaaag tcaannnctt aaatttgtac g 41

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: PCR-Primer

<400> 8
cgtacaaatt taagnnnttg acttaagttt ttatcaaagc 40

<210> 9
 <211> 1049
 <212> PRT
 <213> Bacillus megaterium

<400> 9

Met Thr Ile Lys Glu Met Pro Gln Pro Lys Thr Phe Gly Glu Leu Lys
 1 5 10 15

Asn Leu Pro Leu Leu Asn Thr Asp Lys Pro Val Gln Ala Leu Met Lys
 20 25 30

Ile Ala Asp Glu Leu Gly Glu Ile Phe Lys Phe Glu Ala Pro Gly Arg
 35 40 45

Val Thr Arg Tyr Leu Ser Ser Gln Arg Leu Ile Lys Glu Ala Cys Asp
 50 55 60

Glu Ser Arg Phe Asp Lys Asn Leu Ser Gln Ala Leu Lys Phe Val Arg
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Gly Asp Gly Leu Phe Thr Ser Trp Thr His Glu Lys Asn
 85 90 95

Trp Lys Lys Ala His Asn Ile Leu Leu Pro Ser Phe Ser Gln Gln Ala
 100 105 110

Met Lys Gly Tyr His Ala Met Met Val Asp Ile Ala Val Gln Leu Val
 115 120 125

Gln Lys Trp Glu Arg Leu Asn Ala Asp Glu His Ile Glu Val Pro Glu
 130 135 140

Asp Met Thr Arg Leu Thr Leu Asp Thr Ile Gly Leu Cys Gly Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Arg Phe Asn Ser Phe Tyr Arg Asp Gln Pro His Pro Phe Ile Thr
 165 170 175

r Met Val Arg Ala Leu Asp Glu Ala Met Asn Lys Leu Gln Arg Ala
 180 185 190

Asn Pro Asp Asp Pro Ala Tyr Asp Glu Asn Lys Arg Gln Phe Gln Glu
 195 200 205

Asp Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Val Asp Lys Ile Ile Ala Asp Arg
 210 215 220

Lys Ala Ser Gly Glu Gln Ser Asp Asp Leu Leu Thr His Met Leu Asn
 225 230 235 240

Gly Lys Asp Pro Glu Thr Gly Glu Pro Leu Asp Asp Glu Asn Ile Arg
 245 250 255

Tyr Gln Ile Ile Thr Phe Leu Ile Ala Gly His Glu Thr Thr Ser Gly
 260 265 270

Leu Leu Ser Phe Ala Leu Tyr Phe Leu Val Lys Asn Pro His Val Leu
 275 280 285

Gln Lys Ala Ala Glu Glu Ala Ala Arg Val Leu Val Asp Pro Val Pro
 290 295 300

Ser Tyr Lys Gln Val Lys Gln Leu Lys Tyr Val Gly Met Val Leu Asn
 305 310 315 320
 Glu Ala Leu Arg Leu Trp Pro Thr Ala Pro Ala Phe Ser Leu Tyr Ala
 325 330 335
 Lys Glu Asp Thr Val Leu Gly Gly Glu Tyr Pro Leu Glu Lys Gly Asp
 340 345 350
 Glu Leu Met Val Leu Ile Pro Gln Leu His Arg Asp Lys Thr Ile Trp
 355 360 365
 Gly Asp Asp Val Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Glu Asn Pro Ser
 370 375 380
 Ala Ile Pro Gln His Ala Phe Lys Pro Phe Gly Asn Gly Gln Arg Ala
 385 390 395 400
 Cys Ile Gly Gln Gln Phe Ala Leu His Glu Ala Thr Leu Val Leu Gly
 405 410 415
 Met Met Leu Lys His Phe Asp Phe Glu Asp His Thr Asn Tyr Glu Leu
 420 425 430
 Asp Ile Lys Glu Thr Leu Thr Leu Lys Pro Glu Gly Phe Val Val Lys
 435 440 445
 Ala Lys Ser Lys Lys Ile Pro Leu Gly Gly Ile Pro Ser Pro Ser Thr
 450 455 460
 Glu Gln Ser Ala Lys Lys Val Arg Lys Lys Ala Glu Asn Ala His Asn
 465 470 475 480
 Thr Pro Leu Leu Val Leu Tyr Gly Ser Asn Met Gly Thr Ala Glu Gly
 485 490 495
 Thr Ala Arg Asp Leu Ala Asp Ile Ala Met Ser Lys Gly Phe Ala Pro
 500 505 510
 n Val Ala Thr Leu Asp Ser His Ala Gly Asn Leu Pro Arg Glu Gly
 515 520 525
 Ala Val Leu Ile Val Thr Ala Ser Tyr Asn Gly His Pro Pro Asp Asn
 530 535 540
 Ala Lys Gln Phe Val Asp Trp Leu Asp Gln Ala Ser Ala Asp Glu Val
 545 550 555 560

 Lys Gly Val Arg Tyr Ser Val Phe Gly Cys Gly Asp Lys Asn Trp Ala
 565 570 575
 Thr Thr Tyr Gln Lys Val Pro Ala Phe Ile Asp Glu Thr Leu Ala Ala
 580 585 590
 Lys Gly Ala Glu Asn Ile Ala Asp Arg Gly Glu Ala Asp Ala Ser Asp
 595 600 605
 Asp Phe Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Trp Arg Glu His Met Trp Ser Asp
 610 615 620
 Val Ala Ala Tyr Phe Asn Leu Asp Ile Glu Asn Ser Glu Asp Asn Lys
 625 630 635 640

Ser Thr Leu Ser Leu Gln Phe Val Asp Ser Ala Ala Asp Met Pro Leu
 645 650 655
 Ala Lys Met His Gly Ala Phe Ser Thr Asn Val Val Ala Ser Lys Glu
 660 665 670
 Leu Gln Gln Pro Gly Ser Ala Arg Ser Thr Arg His Leu Glu Ile Glu
 675 680 685
 Leu Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Gln Glu Gly Asp His Leu Gly Val Ile
 690 695 700
 Pro Arg Asn Tyr Glu Gly Ile Val Asn Arg Val Thr Ala Arg Phe Gly
 705 710 715 720
 Leu Asp Ala Ser Gln Gln Ile Arg Leu Glu Ala Glu Glu Glu Lys Leu
 725 730 735
 Ala His Leu Pro Leu Ala Lys Thr Val Ser Val Glu Glu Leu Leu Gln
 740 745 750
 Tyr Val Glu Leu Gln Asp Pro Val Thr Arg Thr Gln Leu Arg Ala Met
 755 760 765
 Ala Ala Lys Thr Val Cys Pro Pro His Lys Val Glu Leu Glu Ala Leu
 770 775 780
 Leu Glu Lys Gln Ala Tyr Lys Glu Gln Val Leu Ala Lys Arg Leu Thr
 785 790 795 800
 Met Leu Glu Leu Leu Glu Lys Tyr Pro Ala Cys Glu Met Lys Phe Ser
 805 810 815
 Glu Phe Ile Ala Leu Leu Pro Ser Ile Arg Pro Arg Tyr Tyr Ser Ile
 820 825 830
 Ser Ser Ser Pro Arg Val Asp Glu Lys Gln Ala Ser Ile Thr Val Ser
 835 840 845
 Val Val Ser Gly Glu Ala Trp Ser Gly Tyr Gly Glu Tyr Lys Gly Ile
 850 855 860
 Ala Ser Asn Tyr Leu Ala Glu Leu Gln Glu Gly Asp Thr Ile Thr Cys
 865 870 875 880
 Phe Ile Ser Thr Pro Gln Ser Glu Phe Thr Leu Pro Lys Asp Pro Glu
 885 890 895
 Thr Pro Leu Ile Met Val Gly Pro Gly Thr Gly Val Ala Pro Phe Arg
 900 905 910
 Gly Phe Val Gln Ala Arg Lys Gln Leu Lys Glu Gln Gly Gln Ser Leu
 915 920 925
 Gly Glu Ala His Leu Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Pro His Glu Asp Tyr
 930 935 940
 Leu Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Asn Ala Gln Ser Glu Gly Ile Ile Thr
 945 950 955 960
 Leu His Thr Ala Phe Ser Arg Met Pro Asn Gln Pro Lys Thr Tyr Val
 965 970 975

Gln His Val Met Glu Gln Asp Gly Lys Lys Leu Ile Glu Leu Leu Asp
980 985 990

Gln Gly Ala His Phe Tyr Ile Cys Gly Asp Gly Ser Gln Met Ala Pro
995 1000 1005

Ala Val Glu Ala Thr Leu Met Lys Ser Tyr Ala Asp Val His Gln Val
1010 1015 1020

Ser Glu Ala Asp Ala Arg Leu Trp Leu Gln Gln Leu Glu Glu Lys Gly
1025 1030 1035 1040

Arg Tyr Ala Lys Asp Val Trp Ala Gly
1045

Patentansprüche

1. Cytochrom P450 Monooxygenase, welche zur Oxidation N-heterocyclischer, zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen befähigt ist. (LÖSLICH)
2. ~~Monooxygenase~~ nach Anspruch 1, deren Substrat-bindender Bereich durch ortsspezifische Mutagenese zur funktionalen Aufnahme des N-heterocyclischen Substrats befähigt ist.
3. Monooxygenase nach Anspruch 1 oder 2, abgeleitet von Cytochrom P450 Monooxygenasen bakteriellen Ursprungs.
4. Monooxygenase nach Anspruch 3, abgeleitet von Cytochrom P450 ~~Monooxygenase~~ BM-3 aus ~~Bacillus megaterium~~ mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2, welche wenigstens eine funktionelle Mutation in einem der Aminosäuresequenzbereiche 172-224, 39-43, 48-52, 67-70, 330-335, 352-356, 73-82 und 86-88 aufweist.
5. ~~Monooxygenase~~ nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens eine der folgenden ein- oder mehrfachen Aminosäuresubstitutionen aufweist:
 - a) Phe87Val;
 - b) Phe87Val, Leu188Gln; oder
 - c) Phe87Val, Leu188Gln, Ala74Gly;sowie funktionale Äquivalente davon.
6. Nukleinsäuresequenz, kodierend für eine Monooxygenase nach einem der vorherigen Ansprüche.
7. Expressionskonstrukt, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine kodierende Sequenz, welche eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 6 umfasst.
8. Vektor, umfassend wenigstens ein Expressionskonstrukt

nach Anspruch 7.

9. Rekombinanter Mikroorganismus, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 8.

10. Mikroorganismus nach Anspruch 9, ausgewählt unter Bakterien der Gattung *Escherichia*.

11. Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a1) einen rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 in einem Kulturmedium, gegebenenfalls in Gegenwart eines Substrats, kultiviert; oder
a2) ein Substrat-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 inkubiert; und
b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man aus dem Medium das gebildete Indol und und/oder Indirubin isoliert.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch Kultivierung der Mikroorganismen in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von etwa 30 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 kultiviert.

14. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Indoloxidation durch enzymatische Umsetzung eines Indol-haltiges Mediums bei einer Temperatur von etwa 30 bis 40 °C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das Indol-haltige Medium außerdem bezogen auf Indol einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuß an Reduktionsäquivalenten enthält.

15. Bioreaktor, umfassend ein Enzym nach einem der Ansprüche

1 bis 5 oder einen rekombinanten Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10 in immobilisierter Form.

5 16. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Vektors nach Anspruch 8, oder eines Mikroorganismus nach Anspruch 9 oder 10 zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer zwei- oder mehrkerniger aromatischer Verbindungen.

10 17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Herstellung von Indigo und/oder Indirubin.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neue Cytochrom P450-Monooxygenasen, welche zur Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen befähigt sind, dafür kodierende Nukleotidsequenzen, diese Sequenzen enthaltende Expressionskonstrukte und Vektoren, damit transformierte Mikroorganismen, Verfahren zur mikrobiologischen Oxidation N-heterocyclischer aromatischer Verbindungen und insbesondere Verfahren zur Herstellung von Indigo und Indirubin.

